

01/产品概述

One-Step Tn5 DNA Library Prep Kit for Illumina 是针对 Illumina 高通量测序平台定向开发的 DNA 文库构建试剂盒, 适用于各类纯化后的 DNA 样本 (基因组、质粒、大于 500bp 的 PCR 产物) 的文库制备。该试剂盒通过体外转座技术对 DNA 进行片段化的同时加上部分接头序列, 与传统的 DNA 文库构建方法相比, 降低了模板的需求量、缩短了文库构建时长。该试剂盒共有三种规格, 分别适用于起始 DNA 投入量为 1ng、5ng、50ng 的建库反应。该试剂盒构建的文库经质检合格后可直接用于 Illumina 平台测序分析。

02/适用范围

- 本产品适用于将纯化后的 DNA 样品 (基因组、质粒、大于 500bp 的 PCR 产物等) 制备成 Illumina 高通量测序平台专用文库。

03/产品组分

货号		BR3D301-01/03/06	BR3D302-01/03/06	BR3D303-01/03/06
规格		8/24/96T	8/24/96T	8/24/96T
起始 DNA 量		1ng	5ng	50ng
Tagment Enzyme V1	●	40/120/480μL	-----	-----
Tagment Enzyme V5	●	-----	40/120/480μL	-----
Tagment Enzyme V50	●	-----	-----	40/120/480μL
4× Tagment Buffer	●	40/120/480μL	40/120/480μL	40/120/480μL
5× Stop Buffer*	●	40/120/480μL	40/120/480μL	40/120/480μL
4× Lib Amp Mix	●	100/300/1200μL	100/300/1200μL	100/300/1200μL

*该组分在低温下出现白色沉淀, 属于正常现象, 不影响产品性能, 使用前请置于室温溶解, 可常温保存。

04/保存条件

-20±5°C 储存。

05/自备材料

需自备的试剂: Qubit、无核酸酶水 (DNase、RNase free)、DNA 纯化筛选磁珠 Biori®NGS DNA Clean Beads (BR3N401)、Tagment Index Kit for Illumina (BR3N103)、无水乙醇 (分析纯) 等。

需要自备的仪器设备包括: 磁力架、移液枪、PCR 扩增仪、振荡器、微型离心机等。

需要自备的耗材包括: 0.5mL Qubit 管、1.5mL 离心管、0.2mL PCR 管、枪头、50mL 离心管等。

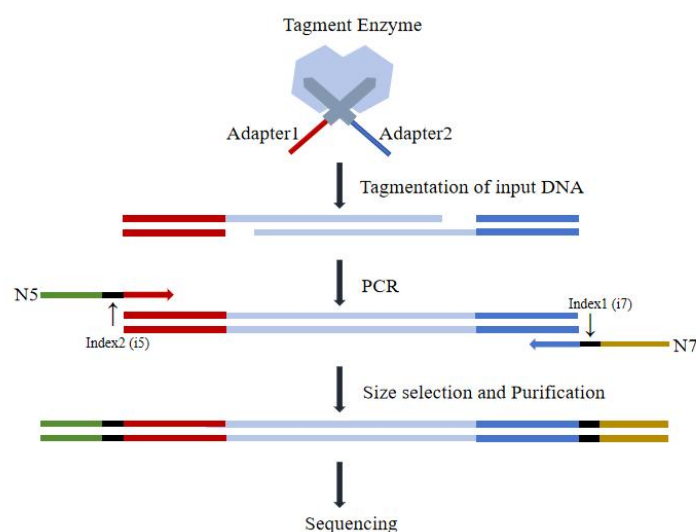
06/注意事项

1. 纯化后的 DNA, 推荐使用灭菌超纯水、DEPC 水、无核酸酶水溶解。
2. DNA 纯度要求: $A_{260}/A_{280}=1.8-2.0$ 。

3. 本试剂盒对 DNA 投入量非常敏感, 建议使用 Qubit 对 DNA 样本进行浓度测定, 请勿使用任何基于吸光度测量为基础的测定方法。
4. 试剂在使用前请先混匀, 并避免反复冻融。试剂盒中的 5× Stop Buffer 在低温下可能会出现白色沉淀, 属于正常现象, 不影响产品性能, 开封后建议置于室温保存。
5. 磁珠使用前应先平衡至室温, 每一次吸取磁珠前需充分混匀。
6. 磁珠漂洗的 80% 乙醇需现配现用。
7. 产物洗脱前应将磁珠置于室温充分干燥 (磁珠表面由光亮褐色变为磨砂褐色), 但需避免过度干燥导致磁珠开裂进而降低纯化得率。
8. 为保证实验的重复性, 建议使用带热盖的 PCR 仪, 并在开始反应前, 提前预热至反应温度。
9. 为避免交叉污染和气溶胶污染, 推荐在实验操作时使用带滤芯的吸头, 在实验结束后, 使用含氯消毒剂或 DNA 清除剂对实验区域进行清洁。

07/产品原理

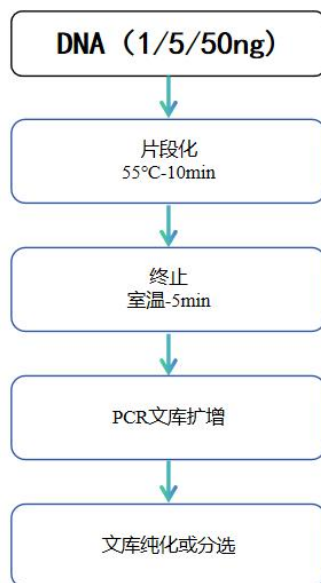
1. 本产品基于转座酶法开发, 其核心原理是转座酶及其转座机制。在 Tagment Enzyme 中包含由转座酶和两种等摩尔接头 Adapter1 和 Adapter2 组成的完整转座子。当转座发生时, 该转座子将 Adapter1 和 Adapter2 插入靶基因中, 即可实现 DNA 片段化的同时在末端加上接头, 得到的片段化产物经过 N5(N5XX)和 N7(N7XX)进行 PCR 扩增, 即可获得用于高通量测序的文库。



2. 文库结构

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC(i5)TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-NNNNN(insert)-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC(i7)ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

08/操作流程



09/使用方法

请在实验前仔细阅读说明书，本说明书适用三种规格的试剂盒，分别对应起始 DNA 量为 1ng/5ng/50ng 的反应。三种规格的试剂盒中某些组分存在差异，请不要混用，以免耽误实验进度。

9.1 DNA 片段化

1-A: 1ng 起始 DNA 片段化（适用于试剂盒 BR3D301）

1. 将 4× Tagment Buffer 室温或冰面上解冻后，轻微震荡混匀后瞬时离心。Tagment Enzyme 用手指轻弹混匀瞬时离心后置于冰上备用。确认 5× Stop Buffer 是否处于室温，若出现沉淀，可 37°C 加热溶解，混匀备用。在 RNase-free 离心管中配制如下反应体系：

组分名称	体积 (μL)
4× Tagment Buffer	5
Tagment Enzyme V1	5
RNase-free ddH ₂ O	10-X
1ng DNA	X
Total	20

转座反应在室温下也可进行，因此体系需在冰上配制，混匀后立即进行孵育反应。

2 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心将管壁反应液离心至管底，立即在 PCR 仪上进行如下反应：

程序	温度	时间	循环数
热盖	75°C	/	/

1	55°C	10min	/
2	4°C	∞	/

3 反应结束后, 立即取出 PCR 管, 加入 5 μ L 5 $\times$ Stop Buffer (该组分使用前室温溶解, 如出现沉淀, 属于正常现象, 可 37° 水浴溶解, 充分混匀后使用) 涡旋混匀后离心, 室温孵育 5min。

4 立即进行步骤 9.2 PCR 文库扩增。

1-B: 5ng 起始 DNA 片段化 (适用于试剂盒 BR3D302)

1. 将 4 $\times$ Tagment Buffer 室温或冰面上解冻后, 轻微震荡混匀后瞬时离心。Tagment Enzyme 用手指轻弹混匀瞬时离心后置于冰上备用。确认 5 $\times$ Stop Buffer 是否处于室温, 若出现沉淀, 可 37°C 加热溶解, 混匀备用。在 RNase-free 离心管中配制如下反应体系:

组分名称	体积 (μ L)
4 $\times$ Tagment Buffer	5
Tagment Enzyme V5	5
RNase-free ddH ₂ O	10-X
5ng DNA	X
Total	20

转座反应在室温下也可进行, 因此体系需在冰上配制, 混匀后立即进行孵育反应。

2 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心将管壁反应液离心至管底, 立即在 PCR 仪上进行如下反应:

程序	温度	时间	循环数
热盖	75°C	/	/
1	55°C	10min	/
2	4°C	∞	/

3 反应结束后, 立即取出 PCR 管, 加入 5 μ L 5 $\times$ Stop Buffer (该组分使用前室温溶解, 如出现沉淀, 属于正常现象, 可 37° 水浴溶解, 充分混匀后使用) 涡旋混匀后离心, 室温孵育 5min。

4 立即进行步骤 9.2 PCR 文库扩增。

1-C: 50ng 起始 DNA 片段化 (适用于试剂盒 BR3D303)

1. 将 4 $\times$ Tagment Buffer 室温或冰面上解冻后, 轻微震荡混匀后瞬时离心。Tagment Enzyme 用手指轻弹混匀瞬时离心后置于冰上备用。确认 5 $\times$ Stop Buffer 是否处于室温, 若出现沉淀, 可 37°C 加热溶解, 混匀备用。在 RNase-free 离心管中配制如下反应体系:

组分名称	体积 (μ L)
4 $\times$ Tagment Buffer	5

Tagment Enzyme V50	5
RNase-free ddH ₂ O	10-X
50ng DNA	X
Total	20

转座反应在室温下也可进行, 因此体系需在冰上配制, 混匀后立即进行孵育反应。

2 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心将管壁反应液离心至管底, 立即在 PCR 仪上进行如下反应:

程序	温度	时间	循环数
热盖	75°C	/	/
1	55°C	10min	/
2	4°C	∞	/

3 反应结束后, 立即取出 PCR 管, 加入 5 μ L 5 $\times$ Stop Buffer (该组分使用前室温溶解, 如出现沉淀, 属于正常现象, 可 37° 水浴溶解, 充分混匀后使用) 涡旋混匀后离心, 室温孵育 5min。

4 立即进行步骤 9.2 PCR 文库扩增。

9.2 PCR 文库扩增

1 将 4 $\times$ Lib Amp Mix 冰面上解冻, 涡旋混匀后瞬时离心后置于冰上备用。配制如下反应体系:

组分名称	体积 (μ L)
上一步反应产物	25
4 $\times$ Lib Amp Mix	12.5
N5XX*	2.5
N7XX*	2.5
RNase-free ddH ₂ O	7.5
Total	50

*Tagment Index Kit for Illumina (BR3N103) 中提供多种 N5XX 和 N7XX, 请根据需要自行选择组合。

2 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心将管壁反应液离心至管底, 在 PCR 仪上进行如下反应:

程序	温度	时间	循环数	反应体积
热盖	105°C	/	/	50 μ L
1	72°C*	5min	1 cycle	
2	98°C	1min	1 cycle	

3	98°C	10s	6-13 cycles** (程序 3-5)
4	60°C	30s	
5	72°C	30s	
6	72°C	1min	1 cycle
7	4°C	∞	/

*72°C 孵育用于生成成熟的 PCR 模板，该步骤不可省略。

**扩增循环数根据核酸实际投入量自行选择，选择原则如下：

起始 DNA 量	适用试剂盒	参考循环数
1ng	BR3D301	11-13
5ng	BR3D302	9-11
50ng	BR3D303	6-9

9.3 文库纯化或分选

如对文库长度分布无特殊要求，可直接使用 1.0×磁珠纯化扩增产物。推荐使用 Biori®NGS DNA Clean Beads (BR3N401) 对扩增产物进行分选。

- 1 将平衡至室温的 Biori®NGS DNA Clean Beads 上下颠倒混匀。
- 2 根据 DNA 片段长度要求，进行双轮分选，将 PCR 产物补水至 100μL，参照下表加入第一轮分选磁珠，涡旋混匀，室温孵育 5min；

文库平均片段大小	350bp	450bp	550bp
第一轮磁珠用量	70 μL (0.7×)	60 μL (0.6×)	50 μL (0.5×)
第二轮磁珠用量	20 μL (0.2×)	15 μL (0.15×)	15 μL (0.15×)

- 3 短暂离心，将样本置于磁力架上 2min 至液体澄清，小心转移上清至干净的离心管；
- 4 参照上表向上清中加入第二轮分选磁珠，涡旋混匀，室温孵育 5min；
- 5 短暂离心，将样本置于磁力架上 2min 至液体澄清，小心移除上清。
- 6 加入 200μL 新鲜配制的 80%乙醇，静置 30s，小心吸弃上清；
- 7 重复步骤 6 一次；
- 8 短暂离心后，小心吸弃残液，室温烘干至磁珠表面哑光；
- 9 加入 22μL 无核酸酶水，涡旋混匀 10s，确保磁珠混匀，室温静置 2min；
- 10 短暂离心后置于磁力架上 2min 至液体澄清，小心吸取 20μL 上清溶液至新的离心管中。

9.4 文库质量检测

- 1 文库浓度测定：使用 Qubit 4.0 Fluorometer 及 Qubit dsDNA HS Assay Kit 检测文库浓度，推荐使用 qPCR 的方式对文库浓度进行绝对定量。
- 2 文库片段分布检测：将制备好的文库在 Qsep1 全自动核酸蛋白分析仪上或通过琼脂糖凝胶电泳进行片段分布检测。

10/常见问题

1 为什么打断的片段偏大?

答: 转座酶对 DNA 投入量十分敏感, DNA 浓度的准确测定对于实验的成功非常重要。文库偏大的原因可能是 DNA 投入量过多或者是 DNA 中存在抑制物。推荐基于荧光法准确测定 DNA 浓度, 以及使用可靠的 DNA 纯化方式, 去除可能干扰转座酶工作的抑制物。

2 为什么打断的片段偏小?

答: 文库偏小的主要原因是 DNA 投入量变小或者是使用了降解的 DNA。建议增加 DNA 的投入量, 使用高质量的 DNA。

3 该产品可以用于哪些 DNA 的片段化?

答: 除了基因组 DNA 的片段化, 也可以应用在质粒、PCR 产物的片段化。如果是 PCR 产物的片段化, 建议长度大于 500bp。